

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВ

А. В. Стадниченко¹, Ю. М. Краснопольский², Т. Г. Ярных¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛЕННОСТИ ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЛИПОСОМ С ЦИТОСТАТИКАМИ

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

²Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», г. Харьков, Украина

Липосомальные лекарственные формы цитостатиков, таких как иринотекан и оксалиплатин, перспективны с точки зрения снижения токсических эффектов при терапии. Одним из критериев качества липосом является окисленность фосфолипидов, формирующих липидный бислой. Окисленность фосфолипидов характеризуется индексом окисленности. Проведены спектрофотометрические исследования готовых липосомальных лекарственных средств и вычисление индекса окисленности фосфолипидов в готовых формах липосомального иринотекана и липосомального оксалиплатина. При измерении оптической плотности растворов образцов были получены оптические плотности, превышающие 2 оптические единицы. Показано, что активные фармацевтические ингредиенты проявляют мешающее действие и не позволяют корректно измерить оптическую плотность растворов образцов и провести расчёт индекса окисленности в готовых формах. Было проведено моделирование технологического процесса получения липосомальных лекарственных средств с отсутствием активных фармацевтических ингредиентов. Показано, что индекс окисленности, как в случае липосомального иринотекана, так и в случае липосомального оксалиплатина, не превышает 0,4, что является приемлемым для липосомальной фармацевтической технологии.

Ключевые слова: иринотекан, оксалиплатин, липосомы, липидный бислой, спектрофотометрия, индекс окисленности.

ВВЕДЕНИЕ

За время, прошедшее с конца прошлого века, липосомальные формы лекарственных средств (ЛС) прошли путь от моделей биологических мембран к объектам научного изучения и практического внедрения. Универсальные свойства по инкапсуляции ЛС позволяют использовать липосомы в широком спектре продукции фармацевтического назначения. Так, уже сейчас на рынке находится несколько десятков ЛС кардиологического, гепатопротекторного, антигипоксического и противоопухолевого действия [1, 2]. Происходит бурное развитие новой области фармацевтической и медицинской науки, ориентирующейся на изучение и применение субмикронных частиц.

В то время как при реализации «классической» химиотерапии предполагается применение неселективных цитостатиков, практика наноразмерных ЛС предусматривает использование более селективных

агентов, способных оказывать меньшее влияние на ткани организма – за счёт снижения кардио-, нефро- и нейротоксичности [3, 4]. В результате наличия дефектов в эндотелиальном слое кровеносных сосудов опухолей, характеризующихся высоким темпом роста, липосомы накапливаются в теле опухоли и высвобождают инкапсулированное лекарственное средство в органе, который нуждается в терапии. Такой эффект носит название Enhanced permeability and retention effect (EPR) и характерен для частиц, размер которых находится в диапазоне 80–400 нм [5, 6].

Одни из современных противоопухолевых ЛС – производные камптотецина, в частности иринотекан, и соединения платины, такие как оксалиплатин, демонстрируют высокую эффективность как в монотерапии, так и в комбинации с другими цитостатиками. Липосомы с цитостатиками иринотеканом и оксалиплатином перспективны как с точки зрения эффек-

тивности, так и с точки зрения снижения токсических проявлений в организме во время терапии, в сравнении с обычными формами цитостатиков – растворами и концентратами. Это делает их перспективными кандидатами для создания липосомальных ЛС [7].

Использование липосомальных ЛС при лечении человека предъявляет высокие требования как к технологиям производства, так и к показателям качества готового продукта. Технологический процесс должен быть воспроизводим, стабилен, иметь обозначенные контрольные точки, не оказывать деградирующего действия на компоненты ЛС [8, 9].

Одним из основополагающих показателей качества липосомальных ЛС является окисленность фосфолипидов, характеризующая значением индекса окисленности I_o . Окислению в большей степени подвержены ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав молекул фосфолипидов. Окисление основного «строительного материала» липосом – фосфатидилхолина выше значений 0,6 приводит к рискам нестабильности продукта во время хранения, а свыше 0,9 – нарушает упорядоченность упаковки бислоя за счёт образования гидропероксидов липидов и альдегидов, обрыва жирнокислотной цепи, что приводит к искажению сферической поверхности, росту напряжения на поверхности липосомы и её нестабильности в эмульсии. Нормальным значением индекса окисленности считается показатель 0,4 [10, 11].

Учитывая, что готовые формы липосомальных ЛС являются комплексными лекарственными средствами со сложной структурой, не всегда возможно на этапе контроля определить те или иные показатели качества, гарантируя при этом соответствие полученных результатов реальному состоянию анализа в ЛС. Во время разработки и реализации технологического процесса получения липосом важно добиться сохранности основных структурообразующих компонентов липосомальных лекарственных средств – фосфолипидов. Процессы окисления липидов приводят к рискам нестабильности продукта во время хранения, нарушается упорядоченность упаковки бислоя за счёт образования гидропероксидов липидов и альдегидов, обрыва жирнокислотной цепи, что приводит к нестабильности

эмульсии. Объективным критерием оценки перекисной деградации фосфолипидов является индекс окисленности. Исходя из этого, является необходимым изучить индекс окисленности при изготовлении липосомальных ЛС с иринотеканом и оксалиплатином еще на стадии фармацевтической разработки и разработки технологического процесса.

Цель исследования – изготовить готовые формы липосомальных ЛС и изучить влияние технологического процесса на окисление фосфолипидов методом спектрофотометрии. При помощи индекса окисленности фосфолипидов в липосомальном ЛС оксалиплатина и липосомальном ЛС иринотекана оценить окисление фосфолипидов в ходе технологического процесса получения ЛС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изготовления липосом использовали яичный фосфатидилхолин фирмы Lipoid, Германия; холестерин, лимонную кислоту моногидрат, дипальмитоилфосфатидилглицерин, растворители – производства фирмы Sigma-Aldrich, США. Липидную плёнку получали на роторном испарителе Buchi 210 с вакуумным контроллером, при остаточном давлении 0,02 атм. Для гомогенизации использовали метод экструзии при высоком давлении. Экструзию проводили при помощи установки Microfluidiser M-110P производства фирмы Microfluidics, США при давлении 1500 атм. Ультрафильтрацию для получения «химического градиента» проводили на установке Minim2, фирмы PALL, США. Оптическую плотность образцов для определения индекса окисленности измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, производства Японии. Липосомальные эмульсии, как в случае ЛС, так и в случае модельных образцов, разрушали путём добавления 100 мкл 10% раствора Triton X-100.

Липосомы с иринотеканом были получены по технологии «химического градиента». Для этого в круглодонные колбы помещали навески липидов с соотношением яичный фосфатидилхолин / холестерин 80:20. Навеску растворяли в минимальном объёме смеси хлороформ – безводный этиловый спирт, до исчезновения опалесценции. Далее готовили липидную плёнку при

помощи роторного испарителя. Обработку вакуумом проводили до получения пористой плёнки и исчезновения запаха хлороформа. В качестве внутреннего буфера использовали 0,2 М буферный раствор лимонной кислоты моногидрата с pH 1,9. Гомогенизацию проводили на гомогенизаторе высокого давления до достижения размера липосом 80–120 нм. Для получения «химического градиента» использовали ультрафильтрационные кассеты с верхним пределом отсекаания 30 кДа. После проведения ультрафильтрации производили загрузку безводного иринотекана гидрохлорида до его концентрации в липосомальной эмульсии 2 мг/мл. Термостатировали липосомальную эмульсию для завершения процесса инкапсуляции 12 часов при комнатной температуре [12].

Для получения липосом с оксалиплатином липиды яичный фосфатидилхолин / холестерин / дипальмитоилфосфатидилглицерин в соотношении 50:20:30 помещали в круглодонную колбу, растворяли в смеси хлороформ – безводный этанол при кратковременном воздействии ультразвука при частоте 35 кГц до исчезновения опалесценции. Получали липидную плёнку при помощи роторного испарителя. Гидратировали липидную плёнку раствором оксалиплатина с концентрацией 4 мг/мл в течение 60 минут при температуре 20°C. Корректировали концентрацию оксалиплатина в готовых липосомах при помощи

воды для инъекций. В конечном продукте концентрация оксалиплатина составила 2 мг/мл, общая концентрация липидов – 20 мг/мл [13].

Исследование индекса окисленности проводили путём измерения оптической плотности растворов, как в случае готовых ЛС, так и в случае модельных образцов, при длинах волн 215 нм и 233 нм. Индекс окисленности (I_o) рассчитывали по формуле:

$$I_o = \frac{A_{233}}{A_{215}},$$

где A_{233} – оптическая плотность при $\lambda = 233$ нм, A_{215} – оптическая плотность при $\lambda = 215$ нм.

Для перевода липосомальной эмульсии в форму раствора использовали 10% раствор Triton X-100 в безводном метиловом спирте. В качестве растворителя для УФ-спектроскопии использовали безводный метиловый спирт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе разработки проведено исследование липосом с иринотеканом и липосом с оксалиплатином. Результаты измерения оптической плотности приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты измерения оптической плотности в растворах разрушенных эмульсий липосом с иринотеканом и липосом с оксалиплатином

Препарат	Оптические плотности		I_o
	$\lambda = 215$ нм	$\lambda = 233$ нм	
Образец с иринотеканом	2,552±0,178	2,485±0,161	неинформативно
Образец с оксалиплатином	2,357±0,162	2,371±0,150	неинформативно

Из таблицы 1 видно, что в случае измерения оптических плотностей для растворов ЛС липосомального иринотекана и липосомального оксалиплатина, с инкапсулированным лекарственным веществом, показатели оптической плотности находятся на уровне выше 2 единиц. Это превышает допустимый диапазон линейного отклика детектора спектрофотометра, и в данном случае значение полученного индекса окисленности становится неинформативным. Также значение погрешности при выполнении параллельных измерений превышает 5%,

что неприемлемо для спектрофотометрического анализа. Данные значения могут быть объяснены мешающим влиянием активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) в полученных ЛС.

Для предотвращения влияния АФИ на результаты эксперимента были получены модельные образцы липосом по технологии ЛС иринотекана и ЛС оксалиплатина, но без добавления АФИ. При этом был полностью воспроизведен процесс изготовления липосом. Было проведено исследование оптических плотностей растворов модельных образцов и определение индексов окисленности.

В таблице 2 представлены результаты измерения оптической плотности растворов модельных образцов и индексы окисленности в модельных липосомальных образцах по технологиям липосомального иринотекана и липосомального оксалиплатина.

Значения измеренных оптических плотностей, представленных в таблице 2, лежат ниже 1, что свидетельствует о возможности проведения измерений. Полученные значения индекса окисленности не превышают 0,4, что свидетельствует об отсутствии деструктирующего влияния

технологических факторов на фосфолипиды, как составляющие части липосом. Было также проведено 5-кратное разведение безводным метиловым спиртом исследуемых образцов с целью подтверждения линейности сигнала. Результаты определения индекса окисленности при 5-кратном разведении совпали со значениями, полученными для неразбавленных образцов, и отличались на величину погрешности (таблица 2). Это свидетельствует о линейности сигнала, и отсутствии эффекта насыщения.

Таблица 2 – Результаты измерения оптической плотности и определения индекса окисленности в модельных образцах по технологиям липосомального иринотекана и липосомального оксалиплатина

Препарат	Оптические плотности		I_o
	$\lambda = 215 \text{ нм}$	$\lambda = 233 \text{ нм}$	
Образец модельных липосом по технологии липосомальной формы иринотекана	0,917±0,008	0,341±0,002	0,372
Образец модельных липосом по технологии липосомальной формы оксалиплатина	0,753±0,006	0,243±0,002	0,323
Значение оптических плотностей и индекса окисленности при 5-кратном разведении образцов			
Образец модельных липосом по технологии липосомальной формы иринотекана	0,182±0,001	0,068±0,0006	0,373
Образец модельных липосом по технологии липосомальной формы оксалиплатина	0,149±0,001	0,048±0,0004	0,322

Полученные значения индексов окисленности свидетельствуют об отсутствии влияния используемых технологических методов, в частности, гомогенизации при высоком давлении и ультразвуковой обработки, на степень окисленности фосфолипидов в разрабатываемых ЛС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Спектрофотометрическое исследование растворов липосомальных форм ЛС иринотекана и оксалиплатина, разрушенных добавлением раствора Triton X-100, показало, что ввиду большой оптической плотности образцов достоверно рассчитать индекс окисленности фосфолипидов не представляется возможным. Это обусловлено присутствием АФИ в готовых ЛС.

2. В результате исследования оптических плотностей модельных растворов, полученных по технологии готовых ЛС, но без добавления АФИ иринотекана и оксалиплатина, и расчёта индекса окисленности фосфолипидов на модельных об-

разцах липосом установлено, что полученные значения индексов окисленности не превышают 0,4, что допустимо для фармацевтической технологии липосомальных ЛС. Это позволяет использовать предложенные технологии в дальнейшей разработке липосомальных форм иринотекана и оксалиплатина.

SUMMARY

A. V. Stadnichenko, Y. M. Krasnopolsky,
T. G. Yarnykh

RESEARCH OF PHOSPHOLIPIDS OXIDATION DURING PRODUCTION OF LIPOSOMES WITH CYTOSTATICS

Liposomal medicinal forms of cytostatics such as irinotecan and oxaliplatin are promising from the view point of reducing toxic effects during therapy. One of the qualitative criteria of liposomes is oxidation of phospholipids forming a lipidic bilayer. Oxidation of phospholipids is characterized by an oxidation index. Spectrophotometric studies of finished drugs and calculation of the phospholipids oxidation index in ready-made forms

of liposomal irinotecan and liposomal oxaliplatin have been carried out. While measuring optical density of sample solutions optical densities exceeding 2 optical units have been obtained. It is shown that active pharmaceutical ingredients exhibit an interfering effect and do not allow to measure the optical density of sample solutions correctly and calculate the oxidation index in ready-made forms. Modeling of the technological process for obtaining liposomal drugs with the absence of active pharmaceutical ingredients has been carried out. It has been shown that the oxidation index both in the case of liposomal irinotecan and in the case of liposomal oxaliplatin does not exceed 0,4 which is acceptable for liposomal pharmaceutical technology.

Keywords: irinotecan, oxaliplatin, liposomes, a lipidic bilayer, spectrophotometry, oxidation index.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников, А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов / А. Ю. Барышников // Актуальные вопросы онкологии. – Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–31.
2. Шве́ц, В. И. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии / В. И. Шве́ц, Ю. М. Краснополя́кий // Провизор. – 2008. – № 3. – С. 18–24.
3. Чехун, В. Ф. Создание новых лекарственных форм на основе нанокомпозитных материалов для решения современных проблем онкологии / В. Ф. Чехун // Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. – 2011. – Т. 9. – № 1. – С. 261–274.
4. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention / A. Albini [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2010. – Vol. 102. – P. 14–25.
5. Greish, K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting / K. Greish // Methods Mol Biol. – 2010. – № 624. – P. 25–37.
6. Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols / S. R. Grobmyer [et al.] // Humana Press. – 624 p.
7. Efficacy of treatment with irinotecan and oxaliplatin combination in FU-resistant metastatic colorectal cancer patients / E. Bajetta [et al.] // Oncology. – 2004. – № 66. – P. 132–137.
8. Liposome: classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh [et al.] // Nanoscale Res Lett. – 2013. – № 8. – P. 102–109.
9. Liposome Drug Products. Guidance for Industry. Pharmaceutical Quality / CMC. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – 2015. – 36 p.
10. Краснополя́кий, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине / Ю. М. Краснополя́кий, А. С. Дудниченко, В. И. Шве́ц. – Харьков: Издательский центр НТУ «ХПИ». – 2011. – 227 с.
11. Torchilin, V. P. Liposomes. Practical approach / V. P. Torchilin. V. Weissing. – 2nd edition. – Oxford press. – 2003. – 396 p.
12. Исследование стабильности иринотекана при использовании различных методов загрузки липосом / А. В. Стадниченко [и др.] // ScienceRise: Pharmaceutical Science. – 2016. – Vol. 2. – P. 30–36.
13. Стадниченко, А. В. Вивчення впливу заряду ліпідної мембрани при створенні ліпосом із оксаліплатином / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснополя́кий, Т. Г. Ярних // Вестник фармации. – 2016. – № 4. – С. 34–37.

Адрес для корреспонденции:

61002, Украина,
г. Харьков, ул. Пушкинская, 53,
Национальный фармацевтический университет,
кафедра технологии лекарств,
e-mail: alstn31124@gmail.com,
Стадниченко А. В.

Поступила 22.05.2017 г.